

ZÁRÓJELENTÉS

„A napraforgó-peronoszpórával szembeni szisztémikus indukált rezisztencia citológiai és molekuláris genetikai háttere” c. témához

Témavezető: Dr. Bán Rita

Bevezetés, célkitűzések

A napraforgó egyik legveszélyesebb betegsége a napraforgó-peronoszpóra (*Plasmopara halstedii* (Farl.) Berlese et de Toni). Az ellene való védelem leghatékonyabb eszközei a rezisztens fajták (hibridek) és a fungicides csávázás. Az ellenálló hibridekkel szemben azonban a kórokozónak újabb és újabb patotípusai alakulnak ki (Gulya 2007); több esetben tapasztalták továbbá, hogy az alkalmazott fungicidek hatékonysága csökkent, mivel a gombának új, toleráns törzsei jelentek meg (Albourie et al. 1998). Mindezek komoly kihívások elé állítják a termesztőket, a nemesítőket és a kutatókat.

Ezekre a problémákra adhat egy új, alternatív megoldást az indukált rezisztencia a növények védelme érdekében az agrotechnikai, genetikai és kémiai védelem mellett. Az indukált rezisztencia kialakítható különböző növényi aktivátorokkal, amelyek kondicionálják a növényt, azaz a kezelést követően ellenállóvá teszik a betegségekkel szemben.

Vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy milyen mértékben lehet különböző növényi aktivátorok, nevezetesen a BTH (1,2,3-benzotiadiazol-7-tiokarboxilsav-S-metilészter, korábbi márkanévén Bion 50 WG), a DCINA (2,6-diklórizonikotinsav) és a BABA (DL- β -aminovajsav) felhasználásával növelni a napraforgó ellenállóságát a peronoszpórával szemben, valamint hogyan nyilvánul meg az általuk előidézett szisztémikus aktivált rezisztencia (SAR) sejt-, szöveti és genetikai szinten. Ezen aktivátorok hatásáról más növényi kultúrákban már születtek eredmények (pl. Cohen et al. 1994, Pajot et al. 2001). Munkánk legfőbb célja végső soron az volt, hogy hozzájáruljon a SAR alkalmazhatóságához az integrált növényvédelemben a napraforgó-peronoszpóra elleni küzdelemben.

Az első két év eredményei

Az első évben kialakítottuk a kísérleti rendszer optimális körülményeit. A korábbi évek során begyűjtött napraforgó-peronoszpóra patotípusok (izolátumok) közül kiválasztottuk a vizsgálatok számára legmegfelelőbbeket (100, 700, 710). Az izolátumokból egysporangium tenyészeteket állítottunk elő és ezeket felszaporítottuk. A napraforgófajták (vonalak) közül olyanokat választottunk, amelyek inkompatibilis és kompatibilis kapcsolatok vizsgálatára alkalmasak (GK 70, DM2, HA 89, RHA 274, HA 335, RHA 340). Külön vizsgáltuk az eltérő rezisztenciatípusokat: míg az RHA 340-es vonal (a 700-as patotípussal szemben) ún. HLI (hypocotil-limited) típusú rezisztenciát mutat, amelynek során a kórokozó csak a gyökerek és a hipokotil alsóbb részeit képes megfertőzni és nem tud továbbterjedni, addig a HA 335-ös vonalra, ugyanezen patotípussal szemben a teljes rezisztencia, vagy immunitás a jellemző, amely megakadályozza a gomba bejutását a növénybe.

Optimalizáltuk a növényi aktivátorokkal (legelőször a BTH-val) való kezelés módját (az alkalmazás idejét és a koncentrációkat). Kidolgoztuk a kísérlet tüneti és mikroszkópos értékelésének módszerét.

A második évben vizsgálatokat végeztünk arra vonatkozóan, hogy milyen mértékben képes ellenállóságot indukálni a BTH (Bion 50 WG) és van-e különbség az eltérő gazda-parazita kapcsolatrendszerekben. Az első, valamint a második év kísérletei során begyűjtött és fixált növényi mintákat mikroszkópi vizsgálatnak vetettük alá (fluoreszcens mikroszkóp) és sejt, illetve szöveti szinten vizsgáltuk a kórokozó és a gazdanövény közötti kapcsolatot (nekrózis, hiperszenzitív reakció, másodlagos sejtosztódás, aktív oxigénvegyületek, micélium, hausztórium, oospórák megjelenése).

Az első két évben öt kompatibilis és három inkompatibilis gazda-parazita kapcsolatot tanulmányoztunk. Az eredmények alapján az összes kompatibilis gazda-parazita kapcsolatban a BTH-val kezelt fogékony növények fertőzöttsége (a sziklevélen megjelenő sporuláció és a lombszelekek klorózisa) szignifikánsan kisebb volt, mint a kezeletlen, fertőzött növényeké (Bán et al. 2004a, b). Az aktivátorral történő előkezelés sokkal hatékonyabb volt a fertőzést követő kezelésnél, amely egybeesik más kutatók eredményeivel (Sticher et al. 1997, Tosi et al. 1999). Az alkalmazott aktivátor-koncentrációk (160 és 320 ppm) között nem találtunk szignifikáns különbséget a fertőzést csökkentő hatás tekintetében.

A növényaktivátorral is kezelt fogékony napraforgó növények közül szignifikánsan több maradt életben a kezeletlenekhez képest, amely ugyancsak a BTH kedvező hatását bizonyítja a fertőzéssel szemben. Kísérleteink alapján a Bion 50 WG jelentősen mérsékelte a peronoszpóra növekedéscsökkentő hatását is, de teljesen nem tudta ellensúlyozni a törpülést. Az aktivátorral kezelt és fertőzött fogékony növények ugyanis statisztikailag magasabbak voltak a kezeletlen, fertőzött növényeknél, de szignifikánsan alacsonyabbak a kezeletlen, nem fertőzött egyedeknél.

Az inkompatibilis gazda-parazita kapcsolatok vizsgálatakor a növények egyikén sem találtunk betegségekre utaló jeleket (makroszkópikus tüneteket). Az ellenálló növények közül egy sem pusztult el.

A szövettani vizsgálatok eredményei alapján elmondható, hogy a kompatibilis gazda-parazita kapcsolatok szármetszeteit vizsgálva a Bion-os kezelés hatására szignifikánsan kevesebb gombaképlet (micélium és hausztórium) alakult ki a szövetekben. A fertőzés visszaszorításában az aktivátorral történő kezelés hatására kialakuló nekروزisok, valamint az aktív oxigénfajták nagyobb aránya játszott szerepet (az aktív oxigénvegyületek jelenlétét DAB festéssel vizsgáltuk).

Jelentős különbséget tapasztaltunk a két ellenálló napraforgó vonal válaszreakcióiban a mikroszkópikus tüneteket illetően. A HA 335-ös vonalra jellemző teljes rezisztencia (immunitás) a fertőzésre adott igen korai – vagyis a fertőzést követő 3. napon létrejövő – hiperszenzitív reakciónak (HR) tulajdonítható. Az immunaktivátorral történő kezelés, úgy tűnik, még aktívabbá tette a növények védekezési rendszerét, hiszen a HR a kezelt növényekben nagyobb mértékű volt. Hasonló arányban alakult ki azonban nekروزis és keletkeztek aktív oxigénvegyületek a kezelt és kezeletlen immunis növényekben. A HLI rezisztenciatípusú RHA 340-es napraforgó vonalra nem volt jellemző a fertőzésre adott korai növényi válaszreakció, bár a kezeletlen növényekben meg lehetett figyelni aktív oxigénvegyületek kismértékű felhalmozódását. A fertőzést követő 10. naptól azonban jelentősen megnövekedett a sejtnekروزisok előfordulása, valamint az aktív oxigénvegyületek kialakulása. Érdekes ugyanakkor, hogy a Bion-nal kezelt HLI rezisztenciatípusú növényekben ezek a reakciók sokkal kisebb mértékben voltak megfigyelhetők, mint a kezeletlen, fertőzött, ellenálló növényekben.

A fenti eredményeket összevetve az indukált rezisztencia megnyilvánulása szöveti szinten nagyon hasonló volt a genetikai rezisztenciához a vizsgált gazdaparazita kapcsolatokban.

A harmadik év eredményei

A harmadik kísérleti évben egyrészt megismételtük az előző év vizsgálatait és hasonló eredményeket kaptunk: a BTH-val kezelt és peronoszpórára fogékony egyedek szöveteiben a fertőzést követően hiperszenzitív reakciót, sejtnekrózisokat és másodlagos sejtosztódást figyeltünk meg, amely hasonló volt a genetikai rezisztenciával rendelkező növények reakciójához.

A továbbiakban kíváncsiak voltunk arra, hogy a csírákban alkalmazott BTH hatásos-e abban az esetben is, ha a fertőzés lombleveles korban éri a növényt. A minták egy részénél ezért a Bionos csírákezelést követően a lomblevelet fertőztük oly módon, hogy az ültetés utáni 13. napon (az első lomblevél megjelenésekor) 50 ezer db sporangium/ml koncentrációjú oldatba mártott szűrőpapírt helyeztünk a két első lomblevél közé. Azt tapasztaltuk, hogy a kezelt növények lomblevelein csökkent mértékű volt a megbetegedés a kezeletlen egyedekéhez képest. A BTH tehát a későbbi, lombfertőzéssel szemben is megvédte a fogékony növényeket.

Ebben az évben még további két növényi aktivátor, a DCINA (2,6-diklórizonikotinsav) és a BABA (DL- β -aminovajsav) napraforgó-peronoszpóra elleni hatását vizsgáltuk és hasonlítottuk össze a már ismert BTH hatásával (Körösi et al. 2007a, b). Két napraforgó fajtát (GK 70, Samantha) és három növényi vonalat (HA 335, HA 89, RHA 288) fertőztünk a kórokozó 700-as és 710-es patotípusával. A növényi aktivátorokat különböző koncentrációkban alkalmaztuk (BTH: 160ppm, DCINA: 100, 200ppm, BABA: 100, 250, 500, 1000, 2000ppm). A BTH-hoz hasonlóan mindkét növényi aktivátor hatékonyan csökkentette a fiatal napraforgó növényeken megjelenő tipikus betegségtüneteket (sporuláció, törpülés, klorózis), valamint gátló hatású volt az érintett növényi szövetekben terjedő gombaképletekre.

A DCINA két koncentrációja között nem találtunk szignifikáns különbséget, míg a BABA esetében az alacsonyabb koncentrációjú oldatok (100, 250 ppm) nem voltak hatásosak. A növekvő koncentrációjú BABA-oldatok (500, 1000, 2000ppm) növekvő hatékonyságot mutattak. Az aktivátorok hatására olyan – a BTH-hoz nagyon hasonló - növényi válaszreakció (sejtnekrózis) jelent meg a fertőzési helyek körül,

amely a PI rezisztenciagént/géneket hordozó fajtákra jellemző. Érdekes módon a vizsgált aktivátorok in vitro körülmények között kismértékben gátolták a kórokozó sporangiumainak a csírázását.

A negyedik és ötödik év eredményei

A pályázat futamideje eredetileg 4 év volt, de a negyedik évben (2006-ban) egy év halasztást kértem és kaptam a Kuratóriumtól, mert szülési szabadságon voltam a kislánnyommal. Ennek ellenére a kutatócsoport ebben az évben is folytatta a munkát, amelyben a témavezető nem tudott részt venni. A kutatócsoport azonban kibővült, hiszen a genetikai vizsgálatok, az adatok feldolgozása több személyt igényelt. Így egyéb megbízás címén finanszíroztuk két hallgatónk (Bán Gergely és Lázár Nelli), intézeti adminisztrátorunk (Szörényiné Várszegi Erzsébet) és kertészünk (Simon Sándor) munkáját. A pályázatban szereplő kutatók mellett az előbbi személyek közreműködése nagy segítség volt a kitűzött célok megvalósításában. Diplomaterves és tudományos diákköri dolgozatot készítő hallgatók egyébként folyamatosan dolgoztak (és dolgoznak) a kutatócsoportban a pályázati időszak alatt, amely egyrészt az ő előrehaladásukat (képzésüket), másrészt saját munkánkat segítette (segíti).

A negyedik-ötödik évben elvégzett genetikai vizsgálatokkal az indukált rezisztencia molekuláris-genetikai hátterére kívántunk rávilágítani, megteremtve az alapot a további molekuláris munkákhoz. Először arra kerestük a választ, hogy a BTH kezelés, majd a fertőzés hatására hogyan változik meg a különböző szintű rezisztenciával rendelkező növényekben az antioxidáns enzimek (polifenol-oxidáz, guajakol-peroxidáz, kataláz) aktivitása.

Első kísérleteinkben három beltenyésztett napraforgó vonalat (RHA 274, RHA 340 és HA 335) és a napraforgó-peronoszpóra 700-as patotípusát használtuk, így egy fogékony és két rezisztens kapcsolatot vizsgáltunk. A makroszkópi és mikroszkópi vizsgálatok módszere és eredménye az előzőekéhez hasonlóak voltak. Mindezek mellett spektrofotométerrel vizsgáltuk az antioxidáns enzimek aktivitását. Spektrofotométeres mérésünk alapján megállapítottuk, hogy a fertőzés hatására mindhárom gazda-parazita kapcsolatban egyaránt megnövekedett a polifenol-oxidáz és a guajakol-peroxidáz szintje. Az immunaktivátorral is kezelt, fogékony növényekben (RHA 274) magasabb polifenol-oxidáz és guajakol-peroxidáz aktivitást

tapasztaltunk a csak fertőzött növények aktivitásához képest. A teljes rezisztenciával rendelkező növényekben (HA 335) a fogékony növényekhez hasonló változást figyeltünk meg a BTH kezelés hatására, viszont a részleges rezisztenciával rendelkező növények (RHA 340) esetében nem volt egyértelmű az immunaktivátor hatása ezen antioxidáns enzimek aktivitásának változására.

Tovább vizsgálva az indukált rezisztencia hátterében meghúzódó folyamatokat, PCR technikával arra kerestük a választ, hogy milyen molekuláris szintű változások következnek be a különböző napraforgó genotípusokban a BTH-val való kezelés és a fertőzés hatására. Három enzimet, illetve ezek génjeinek expresszióját vizsgáltuk, amelynek központi szerepe van a kórokozók elleni küzdelemben a növényekben, nevezetesen a glutation-S-transzferázt (GST), a defenzint (PDF) és a katalázt (CATA 2). Ezekről az eredményekről a kutatócsoport a 2008. júniusában megrendezendő Nemzetközi Napraforgó Konferencián számol be (a proceedings megjelenés alatt).

A PCR vizsgálatokhoz az előzőekben felsorolt három (egy kompatibilis és két inkompatibilis) gazda-parazita kapcsolatból származó növényekből a fertőzést követő 3., 9., 13. és 16. napon vettünk mintát. A csíranövényeket folyékony nitrogénbe helyeztük. A növényi RNS kivonása a Qiagen Plant Mini kit segítségével történt. A kivont RNS-t RNáz inhibitorral és DNáz I-el kezeltük. Az RNS koncentrációt spektrofotométerrel állítottuk be 1µg/µl-re. A PCR reakcióhoz a primereket Radwan et al. (2005) és Aczpilicuenta et al. (2007) alapján választottuk. A PCR reakciót Gene Amp PCR System 2700 géppel végeztük. A PCR termékeket elektroforézissel 1%-os agaróz gélen futtattuk, etídium-bromid segítségével vizualizáltuk és Molecular Imager Gel Doc system segítségével fényképeztük.

Eredményeink alapján megnövekedett GST és PDF aktivitást mértünk a BTH-val kezelt és fertőzött növényekben, amely hasonló szintű volt a genetikailag rezisztens növényekben mért aktivitással. E géntermékek akkumulációja sokkal kisebb volt a csak fertőzött fogékony egyedeknél, mint az ellenálló növényekben. Az aktivátorral történő kezelés a CATA 2 géntermékek szintjét is növelte a fogékony növényekben, a genetikailag ellenálló vonalakban azonban nem volt egyértelmű a hatása.

A BTH tehát pozitív hatással van és erősíti a napraforgó természetes védelmi rendszerét azáltal, hogy növeli három olyan géntermék akkumulációját, amelyeknek szerepük lehet a napraforgó-peronoszpóra elleni indukált rezisztencia kialakításában.

Irodalomjegyzék

- Albourie, J. M., Tuorvieille, J. és Labrouhe, D.T.(1998): Resistance to metalaxyl in isolates of the sunflower pathogen *Plasmopara halstedii*. p. 235-242 In: European Journal of Plant Pathology 104.
- Azpilicueta, E. C., Benavides, P.M., Tomaro, L.M., and Gallego, S.M. 2007. Mechanism of CATA3 induction by cadmium in sunflower leaves. p. 1-7. In: Plant Physiology and Biochemistry.
- Bán R., Virányi F., Körösi K., Nagy S. (2004a): Indukált rezisztencia a napraforgó-peronoszpórával szemben. p. 545-550 Im: Növényvédelem 40 (11).
- Bán, R., Virányi, F., Komjáti, H. (2004b): Benzothiadiazole-induced resistance to *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. Et de Toni in sunflower. Advances in Downy Mildew Research vol.2. 265-273.
- Cohen, Y., Niderman, T., Möisinger, E., Fluhr, R. (1994): β -aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plant and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*. p. 59-66 In: Plant Physiology 104
- Gulya, T. 2007. Distribution of *Plasmopara halstedii* races from sunflower around the world. p.121-134.. In: Advances in Downy Mildew Research, Vol. 3.
- Körösi, K., Lázár, N., Virányi, F. (2007a): Resistance response to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus*) activated by chemical inducers. Advances in Downy Mildew Research, vol. 3 p. 237-241.
- Körösi, K., Virányi, F., Bán, R. (2007b): Növényi aktivátorok hatása a napraforgó peronoszpórási betegségére. Növényvédelem 43 (12): 597-602.
- Pajot, E., Le Corre, D., Silué, D. (2001): Phytogard and DL-b-amino butyric acid (BABA) induces resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in lettuce (*Lactuca sativa* L.). p. 861-869. In: European Journal of Plant Pathology 107.
- Radwan, O., Mouzeyar, S., Venisse, J.S., Nicolas, P., and Bouzidi M.F. 2005. Resistance of sunflower to the biotrophic oomycete *Plasmopara halstedii* is associated with a delayed hypersensitive response within the hypocotyls. p. 1683-2693. In: Journal of Experimental Botany. 56. 420.
- Sticher L., Mauch-Mani B., Métraux J.P. (1997) Systemic acquired resistance. Annual Review of Phytopathology 35: 235-270.
- Tosi, L., Luigetti, L., Zazzerini, A. 1999. Benzothiadiazole induces resistance to *Plasmopara helianthi* in sunflower plants. Journal of Phytopathology 147: 365-370.